

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА СИСТЕМУ ПРОТЕИНАЗЫ / ИНГИБИТОРЫ В ДИНАМИКЕ СТРЕСС-РЕАКЦИИ

ГОРОДЕЦКАЯ И.В., ГУСАКОВА Е.А.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

В опытах на 182 половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 220 – 250 г установлена зависимость изменений в системе протеиназы/ингибиторы при стрессе от уровня йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови. Стадия тревоги стресс-реакции (через 1 час после стресса, моделируемого плаванием крыс в клетке в течение 1 часа), характеризующаяся активацией тиреоидной функции, сопровождается стимуляцией трипсиноподобной активности в печени и, особенно, в крови. В стадию резистентности (через 48 часов после стресса) происходит восстановление тиреоидного гомеостаза, нормализация трипсиноподобной активности в крови и ограничение ее возрастания в печени. В стадию истощения стресс-реакции (стрессирование по 1 часу в течение 10 суток) на фоне угнетения тиреоидной функции развивается наиболее значительное увеличение трипсиноподобной активности и в печени, и в крови. Введение мерказолила (внутрижелудочно в дозе 25 мг/кг в течение 20 суток), вызывающее снижение концентрации йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови, сопровождается уменьшением трипсиноподобной активности. В стадию тревоги стресс-реакции гипотиреоз определяет более выраженную стимуляцию протеолиза в печени и крови, в стадию резистентности – препятствует нормализации этого процесса, а в стадию истощения – способствует его избыточной активации. Введение L-тироксина в «малых» дозах (внутрижелудочно в дозе 1,5 – 3,0 мкг/кг в течение 28 суток) само по себе не изменяющее содержание йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови, не влияет на изученные показатели системы протеолиза. В стадии тревоги и истощения стресс-реакции L-тироксин лимитирует увеличение трипсиноподобной активности в печени и крови, в стадию устойчивости – предупреждает ее стимуляцию в печени. Зависимость изменений в системе протеиназы/ингибиторы при стрессе от уровня йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови связана с их влиянием на активность эндогенных ингибиторов протеиназ (α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина) и проницаемость лизосомальных мембран.

Ключевые слова: йодсодержащие тиреоидные гормоны, протеолиз, стресс.

Abstract.

In the experiments on 182 adult mongrel white male rats weighing 220–250 g the dependence of the changes in the system of proteinases / inhibitors under stress on the levels of iodine-containing thyroid hormones in the blood has been established. The alarm stage of stress reaction (an hour after the stress modelled by the swimming of rats in a cage during one hour) is characterized by the activation of the thyroid function and is accompanied by the stimulation of the trypsin-like activity in the liver, and especially in the blood. At the resistance stage (48 hours after the stress) the restoration of thyroid homeostasis, the normalization of trypsin-like activity in the blood and limitation of its growth in the liver occur. At the stage of exhaustion of stress reaction (an hour of stress within 10 days) on the background of thyroid function depression the most significant increase of trypsin-like activity in the liver and in the blood develops. The introduction of mercazolil (intragastrically in the doses of 25 mg/kg during 20 days) causes decreased concentration of iodine-containing thyroid hormones in the blood and is accompanied by the decrease of trypsin-like activity. At the alarm stage of stress reaction hypothyroidism governs a more marked stimulation of the proteolysis in the liver and in the blood, at the resistance stage it prevents the normalization of this process, at the stage of exhaustion it promotes its excessive activation. The introduction of small doses of L-thyroxin (intragastrically in the doses of 1,5–3,0 μ g/kg during 28 days) does not affect the concentration of iodine-containing thyroid hormones in the blood and the studied indices of proteolysis system. At the alarm and exhaustion stages of stress reaction L-thyroxin limits the increase of the trypsin-like activity in the liver and in the blood, at the resistance stage it prevents its stimulation in the liver. The dependence of the changes in the proteinases / inhibitors system under stress on the level of thyroid hormones in the blood is connected with

their influence on the activity of endogenous proteinase inhibitors (α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin) and the permeability of lysosomes membranes.

Key words: iodine-containing thyroid hormones, proteolysis, stress.

Установлено, что при действии различных раздражителей наблюдается значительное повышение активности протеолитических ферментов [1], и они из фактора регуляции превращаются в фактор повреждения [2]. Одной из причин, обуславливающих эту трансформацию, является снижение активности эндогенных ингибиторов протеиназ и повышение проницаемости лизосомальных мембран [3]. С другой стороны, доказано защитное действие йодсодержащих тиреоидных гормонов (ЙТГ) при стрессе, реализующееся в результате их взаимодействия с клеточным геномом, что приводит к стимуляции локальных стресс-лимитирующих систем – белков теплового шока и антиоксидантных ферментов [4]. Однако значение ЙТГ в изменениях системы протеолиза, вызванных стрессом, до сих пор не исследовалось.

Цель – установить влияние ЙТГ на систему протеиназы/ингибиторы и проницаемость лизосомальных мембран клеток печени при стрессе.

Методы

Опыты поставлены на 182 половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 220–250 г в осенне-зимний период. При содержании животных и при проведении экспериментов с ними соблюдались принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Для достижения поставленной цели сравнивали выраженность изменений в системе протеиназы/ингибиторы при стрессе у крыс с экспериментально вызванным подавлением тиреопроductive функции щитовидной железы и у животных, которым вводили L-тироксин в малых, близких к физиологическим дозах. Крысы были разделены на 13 групп (по 10 особей в каждой): 1 – интактные; 2 – контроль (внутрижелудочное введение 1% крахмального клейстера); 3, 4, 5 – животные, получавшие 1% крахмальный клейстер, подвергнутые стрессу «свободного плавания в клетке» (по 5 особей в стандартной пластиковой клетке (50x30x20 см), заполнен-

ной водой (22°C) на высоту 15 см и закрытой сверху сеткой [5]) в течение 1 часа и взятые в эксперимент через 1 час (стадия тревоги), 48 часов после стресса (стадия устойчивости) и после стресса по 1 часу в течение 10 суток (стадия истощения); 6 – крысы, получавшие мерказолил (ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина) (25 мг/кг внутрижелудочно в 1% крахмальном клейстере в течение 20 суток); 7, 8, 9 – получавшие мерказолил животные, подвергнутые стрессу и взятые в эксперимент в такие же сроки; 10 – крысы, получавшие «малые» дозы L-тироксина (Berlin-Chemie AG, «Менарини Групп», Германия) (1,5–3,0 мкг/кг внутрижелудочно в 1% крахмальном клейстере в течение 28 суток); 11, 12, 13 – получавшие L-тироксин животные, подвергнутые стрессу и взятые в эксперимент в указанные сроки. Крыс забивали декапитацией под уретановым наркозом (1 г/кг массы тела). Концентрацию ЙТГ в крови – общих трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4), их свободных фракций (Т3св и Т4св) – определяли радиоиммунологически с помощью наборов реактивов РИА-Т3-СТ, РИА-Т4-СТ (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), RIA FT3, RIA FT4 (IMMUNOTECH, A Beckman Coulter Company, Чехия). Состояние системы протеолиза оценивали по трипсиноподобной активности (ТпА) и активности основных ингибиторов протеиназ (α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ)) в печени и крови, которые исследовали по И.Ю. Карягиной и др. [6]. Рассчитывали индекс протеолиза (ИП), отражающий напряженность или «управляемость» протеолитических процессов, как отношение ТпА к суммарной ингибиторной емкости (сумма активности α_1 -АТ и α_2 -МГ) [7]. Проницаемость мембран лизосом клеток печени оценивали по относительной свободной активности маркерного фермента лизосомального матрикса – катепсина Д [8]. Указанный показатель представляет собой долю свободной активности в общей, выраженную в процентах. Свободную активность определяли в гомогенате ткани печени, содержащем неразрушенные лизосомы, после инку-

бации с гемоглобином при 37°C в течение 30 минут. Общую активность исследовали после добавления детергента тритон X-100, разрушающего мембраны лизосом, и полного освобождения катепсина Д. Содержание белка в печени определяли по Лоури [9].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Статистика 6.0». Поскольку после первоначального определения характера распределения признака (Shapiro-Wilk, s test) было установлено, что оно отличалось от нормального, далее при попарном сравнении использовали непараметрический метод (Mann-Whitney U test). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В стадию тревоги стресс-реакции концентрация ЙТГ в крови, особенно, их свободных фракций увеличивалась (рис. 1). В ответ на это сывороточный уровень ТТГ снижался. В этот период происходило повышение ТпА в печени на 23% и, в несколько большей степени, в крови – на 33% (табл. 1). В ответ на активацию протеолиза в печени увеличивалась активность α_1 -АТ на 24%. Однако активность α_2 -МГ в ней, напротив, снижалась на 13%. Сывороточная же активность α_2 -МГ повышалась на 28%. Активность α_1 -АТ в крови не отличалась от контроля. В результате ИП в печени был таким же, как в контроле, а в крови возрастал в 1,33 раза. Общая активность катепсина Д не изменялась, однако его свободная активность увеличивалась на 21% (табл. 2). В результате относительная свободная активность указанного фермента повышалась на 26%.

В стадию резистентности сывороточные уровни ЙТГ и ТТГ возвращались к исходным величинам (рис. 1). ТпА в печени также начинала возвращаться к исходному значению, но все же незначительно превышала его (табл. 1). В крови ТпА полностью возвращалась к исходной величине. Изменение активности обоих изученных протеиназных ингибиторов в печени сохраняло свое направление, однако становилось менее выраженным. Активность α_1 -АТ превышала ее значение в контроле на 12%, α_2 -МГ была меньше его на 8%.

Активность α_2 -МГ в крови начинала возвращаться к ее величине в контрольной груп-

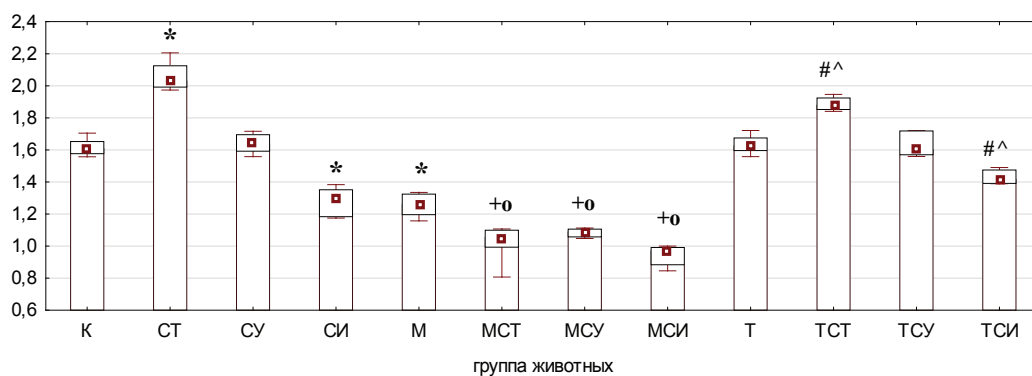
пе животных, однако по-прежнему была выше ее на 16%. Активность α_1 -АТ в крови, как и в стадию тревоги, не отличалась от контроля. Вследствие указанных изменений значение ИП и в крови, и в печени было таким же, как в контроле. Общая активность катепсина Д, как и в стадию тревоги, не отличалась от контроля (табл. 2). Свободная активность исследованного фермента начинала возвращаться к исходному уровню, но по-прежнему превышала его на 10%. Относительная свободная активность фермента в указанный период была выше контроля на 14%.

В стадию истощения стресс-реакции в отличие от предшествующих периодов происходило снижение сывороточного уровня ЙТГ, в наибольшей степени их свободных фракций (рис. 1). В ответ на это уровень ТТГ в крови возрастал. В эту стадию были обнаружены наиболее глубокие изменения активности протеолитических ферментов и их эндогенных ингибиторов (табл. 1). ТпА в печени повышалась на 38%. В крови ТпА увеличивалась еще более существенно – на 52%. Однако, несмотря на это, активность α_1 -АТ и α_2 -МГ падала: в печени на 39 и 23%, в крови – на 29 и 35%. ИП в крови увеличивался, как и в стадию тревоги, но более значительно – в 2,19 раза, а в печени, в отличие от указанной стадии, возрастал в 2,25 раза. В отличие от предыдущих стадий происходило повышение общей активности катепсина Д на 9% (табл. 2). Свободная активность этого фермента увеличивалась в гораздо большей степени – на 56%. По сравнению с ее значением в стадии тревоги и устойчивости относительная свободная активность также возрастала более значительно – на 42%.

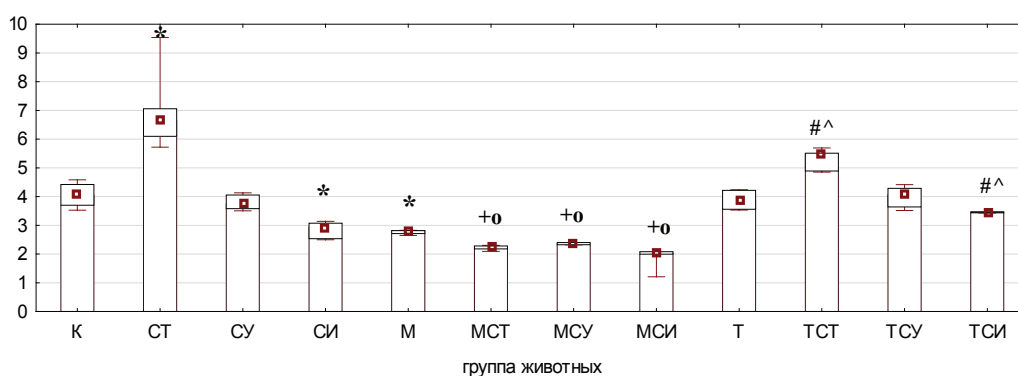
Введение мерказолила вызывало уменьшение сывороточных уровней ЙТГ и, напротив, возрастание концентрации ТТГ (рис. 1), а также падение активности всех исследованных показателей системы протеиназы-ингибиторы: ТпА в печени – на 12%, в крови – на 24%; α_1 -АТ и α_2 -МГ в печени – на 13 и 11%, в крови – на 12 и 17% (табл. 1). Однако ИП как в крови, так и в печени был таким же, как у контрольных животных.

Активность катепсина Д уменьшалась (табл. 2): общая – на 17%, свободная – на 11%, вследствие чего относительная свободная активность этого фермента увеличивалась на 8%.

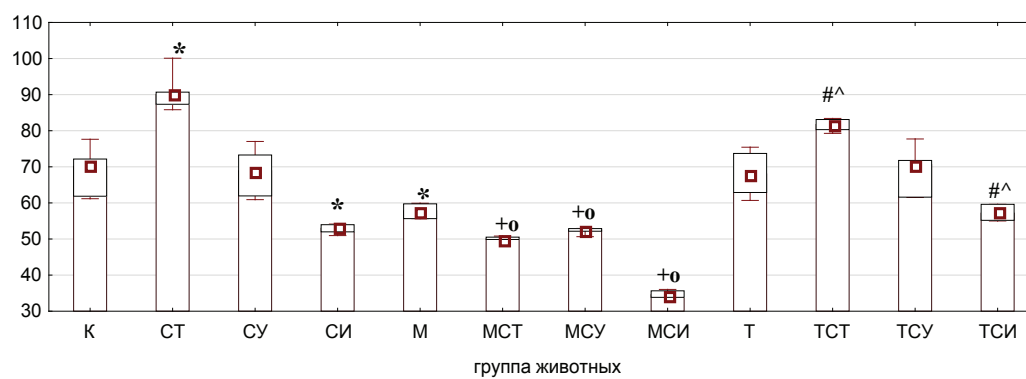
Т3, нмоль/л



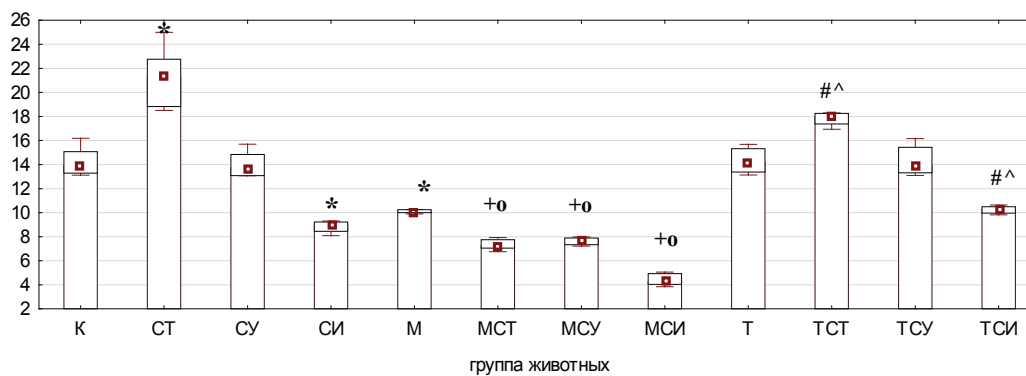
Т3 св, пмоль/л



Т4, нмоль/л



Т4 св, пмоль/л



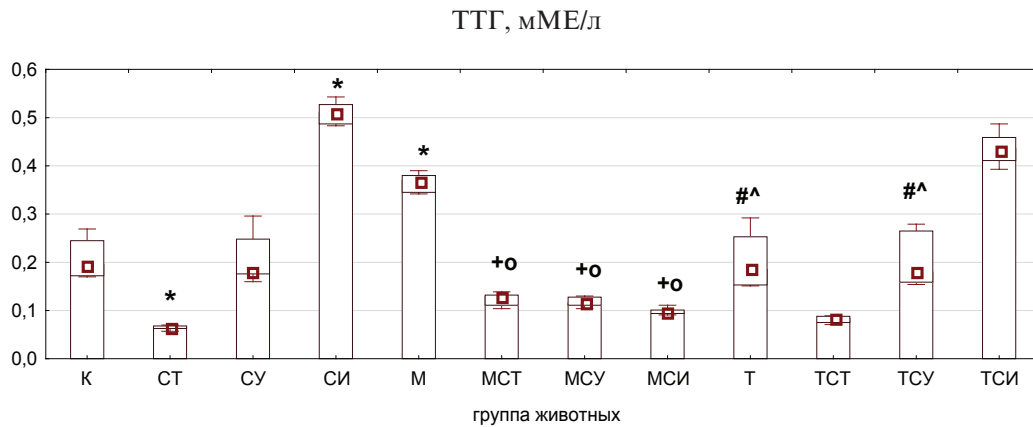


Рисунок 1 – Влияние изменения тиреоидного статуса на концентрацию йодсодержащих тиреоидных и тиреотропного гормонов в крови при стрессе. Примечание: данные представлены в виде графиков «Box and whisker», где □ - медиана; [] - (LQ; UQ) - верхняя граница нижнего квартиля и нижняя граница верхнего квартиля; [] - минимальное и максимальное значения; 2) $p < 0,05$ по отношению: * - к контролю; # - к соответствующей стадии стресса без препаратов; + - к контролю и соответствующей стадии стресса без препаратов; o - к группе животных, получавших мерказолил; ^ - к группе животных, получавших тироксин; 3) группы животных: К – контроль; СТ – стадия тревоги; СУ – стадия устойчивости; СИ – стадия истощения; М – мерказолил; МСТ – мерказолил, стадия тревоги; МСУ – мерказолил, стадия устойчивости; МСИ – мерказолил, стадия истощения; Т – L-тироксин; ТСТ – L-тироксин, стадия тревоги; ТСУ – L-тироксин, стадия устойчивости; ТСИ – L-тироксин, стадия истощения.

Таблица 1 – Влияние изменения тиреоидного статуса на трипсиноподобную активность, активность α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в печени и крови при стрессе

Группа животных	Печень			Кровь		
	ТпА, нмоль/ч·мг белка	Активность α_1 -АТ, мкмоль/с·мг белка	Активность α_2 -МГ, пмоль/с·мг белка	ТпА, нмоль/с·л	Активность α_1 -АТ, мкмоль/с·л	Активность α_2 -МГ, мкмоль/с·л
1. Контроль (n=7)	50,071 (48,048; 52,645)	5,216 (5,094; 5,425)	32,730 (32,163; 33,518)	31,353 (23,398; 35,565)	5,507 (5,294; 5,573)	0,486 (0,424; 0,528)
2. Стадия тревоги (n=7)	61,577 (56,127- 64,046)	6,463 (5,971-6,587)	28,552 (27,861- 29,310)	41,648 (38,373- 43,988)	5,381 (5,135-5,588)	0,624 (0,618- 0,701)
достоверность различий между группами 1-2	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p < 0,01$
3. Стадия устойчивости (n=7)	54,061 (52,064; 57,364)	5,843 (5,635; 5,943)	30,140 (29,532; 30,526)	30,885 (27,610; 32,289)	5,360 (5,192; 5,540)	0,564 (0,549; 0,614)
достоверность различий между группами 1-3	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,01$
достоверность различий между группами 2-3	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p < 0,01$
4. Стадия истощения (n=7)	68,966 (65,076; 74,066)	3,160 (2,963; 3,852)	25,302 (23,667; 26,426)	47,732 (44,924; 54,751)	3,894 (3,699; 4,071)	0,318 (0,261; 0,324)
достоверность различий между группами 1-4	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
достоверность различий между группами 2-4	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
достоверность различий между группами 3-4	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$

5. Мерказолил(n=7)	44,309 (39,032; 48,200)	4,546 (4,412; 4,915)	29,174 (28,616; 30,443)	23,866 (19,186; 26,206)	4,851 (4,347; 4,982)	0,401 (0,335; 0,454)
достоверность различий между группами 1-5	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,05
6. Мерказолил + стадия тревоги (n=7)	64,337 (62,95; 69,183)	3,166 (3,049; 3,762)	23,716 (22,361; 27,110)	44,456 (43,052; 51,008)	3,870 (3,639; 3,996)	0,313 (0,192; 0,332)
достоверность различий между группами 5-6	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05
достоверность различий между группами 1-6	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 2-6	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01
7. Мерказолил + стадия устойчивости (n=7)	60,186 (58,387; 63,023)	3,435 (3,264; 3,908)	24,399 (21,938; 26,692)	41,180 (39,309; 43,988)	3,651 (3,450; 3,978)	0,298 (0,239; 0,334)
достоверность различий между группами 5-7	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05
достоверность различий между группами 1-7	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 3-7	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
8. Мерказолил + стадия истощения (n=7)	78,321 (73,910; 79,128)	1,919 (1,832; 2,037)	19,118 (17,401; 21,418)	58,027 (54,283; 61,303)	2,233 (1,706; 2,650)	0,158 (0,126; 0,206)
достоверность различий между группами 5-8	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 1-8	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 4-8	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01
9. Тироксин (n=7)	51,442 (49,073; 55,018)	5,432 (5,314; 5,521)	33,117 (32,645; 34,017)	27,142 (24,802; 33,225)	5,420 (5,369; 5,522)	0,464 (0,395; 0,465)
достоверность различий между группами 1-9	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
10. Тироксин + стадия тревоги (n=7)	55,293 (52,174- 57,069)	5,834 (5,732-6,112)	34,919 (34,634- 35,137)	36,501 (35,565- 36,969)	6,095 (5,966-6,281)	0,552 (0,504- 0,586)
достоверность различий между группами 9-10	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 1-10	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,05
достоверность различий между группами 2-10	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
11. Тироксин + стадия устойчивости (n=7)	50,306 (49,130; 52,938)	5,584 (5,217; 5,669)	33,617 (32,654; 34,014)	29,949 (25,738; 31,821)	5,783 (5,750; 5,849)	0,529 (0,520; 0,532)
достоверность различий между группами 9-11	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 1-11	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,01	p<0,05
достоверность различий между группами 3-11	p<0,05	p>0,05	p<0,01	p>0,05	p<0,01	p<0,05

12. Тироксин + стадия истощения (n=7)	60,825 (56,982; 63,688)	4,121 (4,054; 4,354)	28,527 (27,930; 29,435)	40,245 (37,437; 42,584)	4,395 (3,957; 4,548)	0,381 (0,365; 0,404)
достоверность различий между группами 9-12	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05
достоверность различий между группами 1-12	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 4-12	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01

Примечание: 1) Результаты представляли в виде Me (LQ; UQ) (Me – медиана, (LQ; UQ) – интерквартильный интервал: верхняя граница нижнего квартиля (LQ) и нижняя граница верхнего квартиля (UQ)); 2) p – обозначение достоверности различий между группами.

Через 1 час после СПК у крыс, получавших мерказолил, концентрация ЙТГ в крови падала (рис. 1). Несмотря на это, сывороточное содержание ТТГ не увеличивалось, как это имело место при снижении уровня ЙТГ у эутиреоидных животных, а, напротив, снижалось. В стадию тревоги происходило более значительное (по отношению к группе «Мерказолил»), чем у стрессированных эутиреоидных животных, повышение ТпА в печени – на 40% и, особенно, в крови – на 66% (табл. 1). Активность α_1 -АТ в печени в отличие от стресса у крыс, не получавших мерказолил, в такой же период исследования не увеличивалась, а падала на 26%. Активность α_2 -МГ в печени хотя и снижалась, как у животных, перенесших СПК без мерказолила, но несколько более выражено – на 17%. Кроме того, в отличие от аналогичной стадии стресса у эутиреоидных крыс наблюдалось уменьшение активности обоих протеиназных ингибиторов в крови: α_1 -АТ – на 18%, α_2 -МГ – на 19%. Вследствие этого ИП в печени увеличивался, чего не наблюдалось в этот период стресс-реакции у животных, не получавших мерказолил, – в 2,02 раза, а в крови возрастал более существенно по сравнению с ними – в 2,44 раза. По сравнению с ее величиной в стадию тревоги у эутиреоидных крыс ТпА была выше: в печени – на 5%, в крови – на 9%. Активность α_1 -АТ и α_2 -МГ, напротив, была существенно меньше: в печени – на 63 и 15%, в крови – на 28 и 64%. ИП был больше – в печени в 2,10 раза, в крови – в 1,63 раза. Общая активность катепсина Д возрастала на 21% (по отношению к группе «Мерказолил») (табл. 2). Свободная активность указанного фермента, как и у крыс, стрессированных без мерказолила, повышалась, однако более выражено – на 61%. В результате относительная свободная

активность катепсина Д увеличивалась также более существенно – на 32%. По отношению к величинам указанных показателей у животных, не получавших мерказолил, в аналогичный период стресс-реакции общая активность катепсина Д была больше на 9%, свободная и относительная свободная активность – на 29 и 14%.

Через 48 часов после СПК у гипотиреоидных животных в отличие от аналогичной стадии стресса у эутиреоидных крыс содержание ЙТГ и ТТГ в крови не возвращалось к исходным значениям, а падало (рис. 1). Вместе с тем, в этот промежуток эксперимента ТпА в печени оставалась значительно увеличенной – на 32% (по отношению к группе «Мерказолил»). ТпА в крови, в отличие от животных, стрессированных без мерказолила, не возвращалась к исходному значению, а сохранялась повышенной – на 55% (табл. 1). Активность α_1 -АТ в печени в отличие от стадии устойчивости у эутиреоидных крыс, перенесших СПК, не повышалась, а снижалась на 21%, а активность α_2 -МГ падала на 14%. Активность α_1 -АТ в крови в отличие от эутиреоидных животных в данную стадию стресс-реакции снижалась на 22%, а α_2 -МГ – не возрастала, как у них, а также падала тоже на 22%. В результате ИП увеличивался в 1,80 раза в печени и в 2,19 раза в крови, чего не наблюдалось у стрессированных эутиреоидных крыс. По отношению к ее величине в стадию устойчивости у эутиреоидных животных ТпА была больше на 12% в печени и на 32% в крови. Активность ингибиторов была, напротив, ниже и в печени, и в крови: α_1 -АТ – на 46 и 31%, α_2 -МГ – на 17 и 55%. ИП в печени был выше в 1,85 раза, в крови – в 2,01 раза. Общая активность катепсина Д возрастала, чего не наблюдалось при стресс-

Таблица 2 – Влияние изменения тиреоидного статуса на общую, свободную и относительную свободную активность катепсина Д

Группа животных	Активность катепсина Д		
	Общая, нмоль тирозина / мин мг белка	Свободная, нмоль тирозина / мин мг белка	Относительная свободная, %
1. Контроль (n=7)	3,852 (3,657; 3,901)	0,581 (0,563; 0,594)	15,11 (14,43; 16,24)
2. Стадия тревоги (n=7)	3,678 (3,648; 3,717)	0,704 (0,693; 0,730)	19,08 (18,76; 19,68)
достоверность различий между группами 1-2	p>0,05	p<0,01	p<0,01
3. Стадия устойчивости (n=7)	3,733 (3,686; 3,759)	0,639 (0,618; 0,684)	17,30 (16,42; 18,56)
достоверность различий между группами 1-3	p>0,05	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 2-3	p>0,05	p<0,05	p<0,01
4. Стадия истощения (n=7)	4,198 (4,150; 4,231)	0,904 (0,846; 0,917)	21,53 (20,12; 21,67)
достоверность различий между группами 1-4	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 2-4	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 3-4	p<0,01	p<0,01	p<0,01
5. Мерказолил (n=7)	3,183 (3,153; 3,275)	0,519 (0,512; 0,571)	16,31 (16,03; 17,77)
достоверность различий между группами 1-5	p<0,01	p<0,05	p<0,05
6. Мерказолил + стадия тревоги (n=7)	4,019 (3,998; 4,113)	0,870 (0,827; 0,883)	21,15 (20,09; 22,38)
достоверность различий между группами 5-6	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 1-6	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 2-6	p<0,01	p<0,01	p<0,01
7. Мерказолил + стадия устойчивости (n=7)	4,030 (4,000; 4,067)	0,826 (0,765; 0,834)	20,22 (19,13; 21,11)
достоверность различий между группами 5-7	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 1-7	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 3-7	p<0,01	p<0,01	p<0,01
8. Мерказолил + стадия истощения (n=7)	4,382 (4,345; 4,480)	1,137 (1,094; 1,211)	25,77 (24,60; 27,64)
достоверность различий между группами 5-8	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 1-8	p<0,01	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 4-8	p<0,01	p<0,01	p<0,01
9. Тироксин (n=7)	3,895 (3,874; 3,930)	0,563 (0,514; 0,569)	14,25 (13,19; 14,58)
достоверность различий между группами 1-9	p>0,05	p>0,05	p<0,05
10. Тироксин + стадия тревоги (n=7)	3,737 (3,681; 3,890)	0,623 (0,605; 0,671)	16,68 (15,55; 17,91)
достоверность различий между группами 9-10	p>0,05	p<0,05	p<0,01
достоверность различий между группами 1-10	p>0,05	p<0,05	p>0,05
достоверность различий между группами 2-10	p>0,05	p<0,05	p<0,05
11. Тироксин + стадия устойчивости (n=7)	3,866 (3,694; 3,886)	0,551 (0,513; 0,583)	14,25 (13,51; 15,19)
достоверность различий между группами 9-11	p>0,05	p>0,05	p>0,05
достоверность различий между группами 1-11	p>0,05	p>0,05	p>0,05
достоверность различий между группами 3-11	p>0,05	p<0,01	p<0,01
12. Тироксин + стадия истощения (n=7)	3,950 (3,925; 3,957)	0,694 (0,661; 0,711)	17,58 (16,41; 18,00)
достоверность различий между группами 9-12	p>0,05	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 1-12	p<0,05	p<0,01	p<0,01
достоверность различий между группами 4-12	p<0,01	p<0,01	p<0,01

Примечание: 1) Результаты представляли в виде Me (LQ; UQ) (Me – медиана, (LQ; UQ) – интерквартильный интервал: верхняя граница нижнего квартиля (LQ) и нижняя граница верхнего квартиля (UQ)); 2) p – обозначение достоверности различий между группами.

се у эутиреоидных крыс (табл. 2). По отношению к группе «Мерказолил это повышение составило 22%. Свободная активность фермента по сравнению с ее значением в данную стадию стресса у животных, перенесших СПК без мерказолила, увеличивалась более существенно – на 53%. Относительная свободная активность катепсина Д также возрастала больше – на 26%. По сравнению с их значениями у эутиреоидных крыс в соответствующую стадию стресс-реакции общая активность катепсина Д была выше на 8%, свободная – на 32%, относительная свободная – на 20%.

Через 10 суток СПК по 1 часу уровни ЙТГ в крови снижались в еще большей степени. Несмотря на это, сывороточное содержание ТТГ не возрастало, как это происходило в такую же стадию эксперимента у эутиреоидных животных, а снижалось (рис. 1). В этот период происходило наиболее существенное изменение всех изученных показателей системы протеолиза, как это наблюдалось и у стрессированных эутиреоидных крыс, но значительно более выраженное (табл. 1). По отношению к группе «Мерказолил» ТпА в печени возрастала на 68%, в крови – на 109%. Активность ингибиторов протеолитических ферментов в печени и крови также падала более существенно по сравнению со стрессом у животных, не получавших мерказолил: α_1 -АТ – на 50 и 47%, α_2 -МГ – на 30 и 50%. В результате ИП возрастал в печени в 4,16 раза и, особенно значительно, в крови – в 5,31 раза. По отношению к ее величине у эутиреоидных животных, перенесших СПК и находящихся в такой же стадии стресс-реакции, все изменения в системе протеолиза были существенно большими: ТпА в печени и в крови была выше на 18 и 33%; активность α_1 -АТ и α_2 -МГ была ниже на 24 и 18% в печени и на 30 и 32% в крови. ИП был больше и в печени в 1,86 раза, и в крови в 2,15 раза. Общая активность катепсина Д (по отношению к группе «Мерказолил») повышалась на 31%, его свободная активность – на 107%, а относительная свободная активность – на 63% (табл. 2). По отношению к их значениям в такую же стадию стресса у крыс, не получавших мерказолил, общая активность катепсина Д была выше на 5%, свободная – на 40%, относительная свободная активность – на 29%.

Введение L-тироксина не оказало влияния на значения изученных нами показателей

тиреоидной функции (рис. 1) и системы протеиназы/антипротеиназы (табл. 1), за исключением незначительного снижения относительной свободной активности катепсина Д – на 6% (табл. 2).

Через 1 час после СПК у крыс, получавших L-тироксин, содержание ЙТГ в крови повышалось, как и у животных, стрессированных без L-тироксина, но в меньшей степени. Сывороточная концентрация ТТГ падала, как и у них но также в менее существенно (рис. 1). В указанный период хотя и наблюдалось увеличение ТпА в печени и в крови, как и у стрессированных без L-тироксина крыс, но значительно менее выраженное (табл. 1). По сравнению с группой «Тироксин» ТпА в печени повышалась на 7%, а в крови несколько больше – на 29%. В ответ на стимуляцию процесса протеолиза происходило увеличение активности обоих ингибиторов протеиназ и в крови, и в печени. Повышение активности α_1 -АТ в печени и α_2 -МГ в крови имело место и у животных, перенесших стресс без получения L-тироксина, однако у получавших его оно было выражено в несколько меньшей степени – на 8 и 19%. Активность α_2 -МГ в печени не снижалась, как у крыс, стрессированных без L-тироксина, а, напротив, возрастала на 6%. Сывороточная активность α_1 -АТ, в отличие от таковой при стрессе у крыс, не получавших L-тироксин, у которых она не изменялась, увеличивалась на 13%. В результате ИП как в печени, так и в крови не отличался от его значения в группе «Тироксин». По сравнению с ее значением у стрессированных крыс, которые не получали L-тироксин, ТпА в печени и крови была меньше на 13 и 17%. Активность α_1 -АТ в печени и α_2 -МГ в крови также была ниже на 12 и 14%, а α_2 -МГ в печени и α_1 -АТ крови, напротив, выше на 20 и 13%. ИП в печени был такой же, а в крови меньше в 1,23 раза. Общая активность катепсина Д, как и при стрессе у животных, не получавших L-тироксин, не изменялась (по сравнению с группой «Тироксин») (табл. 2). Свободная активность изученного фермента хотя и возрастала, как в указанной группе, однако менее существенно – на 14%. Соответственно относительная свободная активность катепсина Д также увеличивалась менее значительно – на 14%. По сравнению с их значениями в аналогичный период после СПК у крыс, не получавших L-тироксин, об-

щая активность катепсина Д была такой же, его свободная и относительная свободная активность были ниже на 14 и 12%.

Через 48 часов после СПК у животных, получавших L-тироксин, уровни ЙТГ и ТТГ в крови возвращались к их величинам в контроле, как это имело место и у животных, не получавших L-тироксин, в такой же период эксперимента (рис. 1). ТпА в печени в отличие от животных, подвергнутых стрессу без L-тироксина, не повышалась (по отношению к группе «Тироксин»), а в крови, как и у них, не изменялась (табл. 1). В отличие от стрессированных крыс, не получавших L-тироксин, активность α_1 -АТ и α_2 -МГ в печени не изменялась. Сывороточная активность α_1 -АТ в отличие от таковой при стрессе без L-тироксина незначительно увеличивалась на 7%, а активность α_2 -МГ повышалась, как и в указанной группе животных, но в несколько меньшей степени – на 14%. ИП как в крови, так и в печени не отличался от его значения в группе «Тироксин». По отношению к ее величине у стрессированных без L-тироксина крыс ТпА в печени была ниже на 8%, в крови – такой же. Активность α_1 -АТ в печени и α_2 -МГ в крови была меньше на 5 и 7%, α_2 -МГ в печени и α_1 -АТ в крови, напротив, незначительно выше на 11 и 8%. В результате ИП как в крови, так и в печени был таким же. Общая, свободная и относительная свободная активность катепсина Д не отличались от их значений в группах «Тироксин» и «Контроль» (табл. 2). Вследствие этого по отношению к соответствующему периоду стресса у животных, не получавших L-тироксин, общая активность указанного фермента была такой же, а свободная и относительная свободная активность были меньше на 15 и 20%.

В стадию истощения стресс-реакции у крыс, получавших L-тироксин, сывороточная концентрация ЙТГ падала менее существенно, чем у животных, перенесших такой же стресс без него (рис. 1). Сывороточная концентрация ТТГ увеличивалась, как и после стресса у животных, не получавших L-тироксин, но также менее значительно. Изменение всех изученных показателей системы протеолиза было менее выраженным по сравнению со стрессированными без L-тироксина животными. ТпА в печени и в крови (по отношению к группе «Тироксин») хотя и увеличивалась, но в гораздо меньшей степени – на 18 и 41% (табл. 1).

Активность α_1 -АТ и α_2 -МГ снижалась, как и в указанной группе крыс, однако менее значительно: в печени – на 25 и 14%, в крови – на 18 и 17%. ИП в печени возрастал только в 1,58 раза, в крови – в 1,74 раза, т.е. менее существенно. По отношению к их значениям у стрессированных крыс, не получавших L-тироксин, ТпА в печени и в крови была меньше на 17 и 24%, а активность α_1 -АТ и α_2 -МГ больше: в печени – на 18 и 10%, в крови – на 11 и 13%. В результате ИП был меньше и в печени, и в крови в 1,47 и 1,37 раза. Общая активность катепсина Д, в отличие от стрессированных животных, не получавших L-тироксин, не изменялась (по отношению к группе «Тироксин») (табл. 2). Свободная активность фермента хотя и возрастала, но в меньшей степени по сравнению с аналогичной группой крыс, стрессированных без L-тироксина, – на 22%. Вследствие этого относительная свободная активность катепсина Д также повышалась менее существенно – на 22%. По отношению к величине данных показателей в соответствующую стадию стресса у животных, не получавших L-тироксин, общая активность катепсина Д была меньше на 6%, свободная – на 37%, относительная свободная активность – на 26%.

Заключение

Стадия тревоги стресс-реакции характеризуется сложной реакцией организма на уровне регуляции системы протеиназы/ингибиторы – стимуляцией протеолиза в печени и, особенно, в крови, в ответ на которую в последней повышается активность α_2 -МГ, а в печени изменяется активность обоих протеиназных ингибиторов, однако разнонаправленно. Увеличение активности α_1 -АТ и уменьшение таковой α_2 -МГ в печени в указанный период времени может свидетельствовать о том, что выброс α_2 -МГ из печени в кровь является более быстрым (в течение 1 часа) процессом, тогда как выброс α_1 -АТ – более отложенным во времени. Это объясняет обнаруженное нами повышение активности только α_2 -МГ в крови в указанный период. Повышение относительной свободной активности катепсина Д, которое является маркером лабильности мембран лизосом, позволяет заключить, что проницаемость лизосомальных мембран в стадию тревоги стресс-реакции увеличивается.

Стадия резистентности приводит к нормализации протеолитической активности в крови и к ограничению ее возрастания в печени, как и изменения активности α_2 -МГ в крови и обоих ингибиторов протеиназ в печени. Развивающаяся в этот период тенденция к нормализации относительной свободной активности катепсина Д указывает на стабилизацию лизосомальных мембран в этот период. В стадию истощения стресс-реакции, как и в стадию тревоги, ТпА увеличивается и в печени, и в крови, однако намного более значительно. При этом не только не происходит компенсаторно-обусловленного роста активности протеиназных ингибиторов, а, напротив, наблюдается ее снижение: в печени уменьшается преимущественно активность α_1 -АТ, а в крови – активность α_2 -МГ. Возможно это отражает различный вклад указанных ингибиторов в регуляцию системы протеолиза в этих условиях. Рост относительной свободной активности катепсина Д указывает на то, что проницаемость лизосомальных мембран в стадию истощения вновь возрастает.

Экспериментальный гипотиреоз *per se* вызывает уменьшение протео- и антипротеиназной активности, как и стабильности мембран лизосом. В стадию тревоги он определяет более выраженную стимуляцию протеолиза в печени и крови, обусловленную падением активности ингибиторов протеиназ, т.е. смещает динамическое равновесие в системе протеолиза в сторону протеолитических ферментов, что приводит в существенному увеличению ИП и способствует большему повышению относительной свободной активности катепсина Д, свидетельствующему о более значительном, чем у эутиреоидных крыс, возрастании проницаемости мембран лизосом. В стадию резистентности экспериментальный гипотиреоз препятствует ограничению изменений активности протеолитических ферментов и их ингибиторов и стабилизации лизосомальных мембран, имевших место у эутиреоидных животных. В стадию истощения он способствует наиболее существенным нарушениям регуляторных взаимоотношений в системе протеолитические ферменты/их ингибиторы, что проявляется в избыточной активации протеолиза вследствие глубокого угнетения активности ингибиторов протеиназ, и обуславливает наиболее значительное увеличение относитель-

ной свободной активности катепсина Д, что доказывает существенное уменьшение устойчивости мембран лизосом.

Введение L-тироксина в малых дозах само по себе не вызывает изменения изученных нами показателей системы протеолиза и приводит к снижению относительной свободной активности катепсина Д, что указывает на стабилизацию под его влиянием лизосомальных мембран. В стадию тревоги стресс-реакции L-тироксин лимитирует увеличение ТпА в крови и в печени в результате стимуляции активности ингибиторов протеолитических ферментов и ограничения увеличения проницаемости мембран лизосом. Меньшее возрастание активности α_1 -АТ в печени и α_2 -МГ в крови по сравнению со стрессированными животными, не получавшими L-тироксин, возможно связано с меньшей активацией протеолиза в этих условиях. В стадию устойчивости стресс-реакции L-тироксин предупреждает стимуляцию ТпА, падение активности α_2 -МГ в печени и, наряду с этим, обеспечивает возрастание активности α_1 -АТ в крови и устраняет повышение относительной свободной активности катепсина Д, т.е. стабилизирует лизосомальные мембраны. В стадию истощения стресс-реакции L-тироксин минимизирует активацию протеолиза в печени и крови, поскольку устраняет депрессию антипротеиназной активности и ограничивает рост относительной свободной активности катепсина Д, что указывает на снижение проницаемости мембран лизосом под воздействием L-тироксина в этих условиях.

Таким образом, нами выявлена зависимость изменений в системе протеиназы/ингибиторы при стрессе от уровня йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови, связанная с их влиянием на активность эндогенных ингибиторов протеиназ (α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина) и проницаемость лизосомальных мембран.

Литература

1. Сувернев, А. В. Основы безопасности пиковой гипертермии / А. В. Сувернев. – Новосибирск : Гео, 2007. – 125 с.
2. Веремеенко, К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – Киев : Здоров'я, 1988. – 199 с.
3. Пупышев, А. Б. Пермеабиллизация лизосомных

- мембран как апоптогенный фактор / А. Б. Пупышев // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 4. – С. 313–324.
4. Роль локальных стресс-лимитирующих систем миокарда в протекторном кардиальном эффекте малых доз тиреоидных гормонов при иммобилизационном стрессе у крыс / И. Ю. Малышев [и др.] // Российский физиологический журнал. – 2000. – Т. 86, № 1. – С. 62–67.
 5. Бондаренко, С. Н. Влияние различных методик стрессирования и адаптации на поведенческие и соматические показатели у крыс / С. Н. Бондаренко, Н. А. Бондаренко, Е. Б. Манухина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 128, № 8. – С. 157–160.
 6. Карягина, И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α 1-антитрипсина и α 2-макроглобулина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Карягина, Р. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лабораторное дело. – 1990. – № 2. – С. 10–13.
 7. Дедуль, М. И. Система протеолиза в сыворотке крови и перитонеальной жидкости при хирургическом лечении больных эндометриозом / М. И. Дедуль, Л. Е. Радецкая, Л. Н. Кирпиченок // Новости хирургии. – 2006. – Т. 14, № 3. – С. 74–80.
 8. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов / под ред В. Ю. Сереброва, Г. А. Сухановой. – Томск : СГМУ, 2008. – 180 с.
 9. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – С. 265-275.

*Поступила 05.12.2013 г.
Принята в печать 09.06.2014 г.*

Сведения об авторах:

Городецкая И.В. – д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Гусакова Е.А. – старший преподаватель кафедры общей и физколлоидной химии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: 210023, Республика Беларусь, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра нормальной физиологии. Тел. раб.: 8 (0212) 37-07-54 – Городецкая Ирина Владимировна.